

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 11 月 27 日 (27.11.2003)

PCT

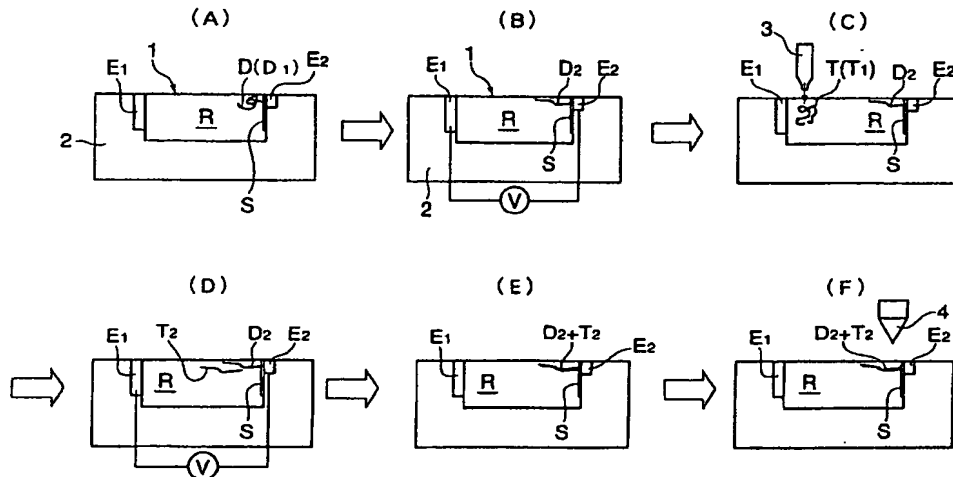
(10) 国際公開番号
WO 03/098216 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 37/00 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/06341 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 眞峯 隆義
(22) 国際出願日: 2003 年 5 月 21 日 (21.05.2003) (MAMINE, Takayoshi) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品
(25) 国際出願の言語: 日本語 川区 北品川 6 丁目 7 番 35 号 ソニー株式会社内 Tokyo
(26) 国際公開の言語: 日本語 (JP). 山本 拓郎 (YAMAMOTO, Takuro) [JP/JP]; 〒
(30) 優先権データ: 141-0001 東京都品川区 北品川 6 丁目 7 番 35 号 ソニー
特願2002-146904 2002 年 5 月 21 日 (21.05.2002) JP 株式会社内 Tokyo (JP).
特願2002-147301 2002 年 5 月 22 日 (22.05.2002) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ソニー株
式会社 (SONY CORPORATION) [JP/JP]; 〒141-0001
東京都品川区 北品川 6 丁目 7 番 35 号 Tokyo (JP).
(74) 代理人: 中村 友之 (NAKAMURA, Tomoyuki); 〒105-
0001 東京都港区 虎ノ門 1 丁目 2 番 3 号 虎ノ門第一ビ
ル 9 階 三好内外国特許事務所内 Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: BIOASSAY METHOD, BIOASSAY DEVICE, AND BIOASSAY SUBSTRATE

(54) 発明の名称: バイオアッセイ方法、バイオアッセイ装置及びバイオアッセイ基板



(57) Abstract: A bioassay method in which the efficiency of an interaction between substances such as hybridization is enhanced by controlling the production of an electric field in a reaction region where the interaction occurs, and a bioassay device for preferably implementing the method are disclosed. The method is conducted to detect an interaction between substances by using a detector (1(10)) at least having a detection surface (S(S')) subjected to a surface treatment for fixing a substance D for detection, a reaction region (R(R')) for providing a field where an interaction between the detection substance D fixed to the detection surface (S(S')) and an added target substance T occurs, and electric field producing means (E) for producing an electric field in the reaction region (R(R')) by causing a potential difference in the reaction region (R(R')). The method comprises a procedure of turning on/off the electric field producing means (E) at a predetermined timing so as to produce/extinguish an electric field.

(57) 要約: ハイブリダイゼーション等の物質間の相互反応作用が行われる反応領域の電場形成をコントロールすることによって、前記相互反応作用の効率を高めることが出来る

[続葉有]



WO 03/098216 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

バイオアッセイ方法及び該方法を好適に実施できるバイオアッセイ装置である。検出用物質Dが固定可能なように
表面処理が施された検出表面S (S') と、前記検出表面S (S') に固定され状態の検出用物質Dと添加された標
的物質Tとの相互反応作用の場を提供する反応領域R (R') と、前記反応領域R (R') に電位差を生じさせて、
該反応領域R (R') 内に電場を形成する電場形成手段Eと、を少なくとも備える検出部1 (10) において物質
間の相互反応作用を検出する方法であって、前記電場形成手段Eによる電場形成を所定タイミングでオン/オフす
る手順を少なくとも含む。

明細書

バイオアッセイ方法、バイオアッセイ装置及びバイオアッセイ基板

5

技術分野

本発明は、バイオインフォマティクス（生命情報科学）分野において特に有用なバイオアッセイ方法、バイオアッセイ装置並びにバイオアッセイ用基板に関する。

10

背景技術

本発明の主たる従来技術を以下説明する。

現在、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、
15 「DNAチップ」と総称。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板が、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始めている。

20 このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。

25 DNAチップによる解析手法の一例を簡潔に説明すれば、ガラス基板やシリコン基板上に固相化されたDNAプローブに対して、細胞、組織等から抽出したmRNAを逆転写PCR反応等に

よって蛍光プローブ dNTP を組み込みながら PCR 増幅し、前記基板上においてハイブリダイゼーションを行い、所定の検出器で蛍光測定を行うという手法である。

ここで、DNA チップは二つのタイプに分類できる。第 1 のタイプは、半導体露光技術を応用したフォトリソグラフィの技術を用いて、所定の基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成していくものであり、米国アフィメトリクス社 (Affymetrix 社) によるものが代表的である (例えば、米国特許第 5,445,934 号公報参照)。この種のチップは、集積度は高いが、基板上での DNA 合成には
10 限界があって、数十塩基程度の長さである。

第 2 のタイプは、「スタンフォード方式」とも称されるもので、先割れピンを用いて、予め用意された DNA を基板上に分注・固相化していくことによって作製されるものである (例えば、米国特許第 5,807,522 号公報参照)。この種のチップは、集積度は前者に比べて低い
15 が、1 kb 程度の DNA 断片を固相化できるという利点がある。

また、現在、プロテインチップを含むバイオセンサーチップと称される、薄い平板上に設けられた微小な検出表面部位に所定の検出用物質を固相化し、この検出用物質に対して、標的物質を含む溶液を微量通水し、両物質の相互反応を表面プラズモン共鳴原理や水晶発振子等の原理を用いて観察・分析するバイオセンサー技術が進展しており、抗体抗原反応やホルモン応答反応等の物質間相互反応の分析における有用な技術となっている。
20

しかしながら、上記した従来の DNA チップ技術やバイオセンサー技術では、二次元である基板の狭小な検出部において、DNA プローブ等の検出用ヌクレオチド鎖やタンパク質等を固相化
25

(固定化)し、ハイブリダイゼーション反応や抗原抗体反応等の物質間の相互反応作用を進行させるという技術であることから、空間的に反応生成物の自由度が制限され、また、反応の際に立体障害が発生する可能性もあるという必ずしも好適とは言えない

5 反応条件下で、専ら反応生成物のブラウン運動に基づいて相互反応作用を進行させるという構成であった。このため、従来のDNAチップ技術又はバイオセンサー技術では、相互反応作用の効率が悪く、反応時間が長いという技術的課題があった。

また、既存のDNAチップ等では、試料溶液は、基板上の所定のスポット部位（検出部）に滴下されるのみであって、前記試料溶液に含まれている標的物質と、前記スポット部位に固定された状態の検出物質との相対的な位置決めを行うための工夫は、何ら

10 講じられていなかった。

そこで、本発明では、ハイブリダイゼーション等の物質間の相互反応作用が行われる反応領域の電場形成をコントロールして、検出用物質と標的物質との間の相対的位置決めや物質構造の調整を行うことによって、相互反応作用の効率を高めることを可能にしたバイオアッセイ方法、バイオアッセイ装置並びにこれらバイオアッセイ方法、バイオアッセイ装置に用いられて好適なバイオアッセイ基板を提供することを主目的とする。

15

20

発明の開示

上記技術的課題を解決するために、まず、本願においては、以下の「バイオアッセイ方法」を提供する。なお、本願において「バイオアッセイ」とは、ハイブリダイゼーションその他の物質間の相互反応に基づく生化学的分析を広く意味する。

25

本発明に係る「バイオアッセイ方法」は、検出用物質が固定可能なように表面処理が施された検出表面と、前記検出表面に固定された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域と、前記反応領域内に電位差を生じさせて、この
5 反応領域内に電場を形成する電場形成手段と、を少なくとも備える検出部において物質間相互反応作用を検出する方法を前提とする方法であって、前記電場形成手段による電場形成を所定タイミングでオン／オフする手順を少なくとも含む方法である。

前記反応領域に形成された電場は、主に、(1)ヌクレオチド鎖等の検出用物質、標的物質を伸長させる作用、(2)検出用物質と離れて存在している標的物質を電気力線に沿って前後方向に移動させる作用、(3)検出用物質と標的物質の相互反応によって得られた反応生成物(検出用物質と標的物質の結合体)の高次構造を、蛍光標識された標的物質や前記反応生成物に特異的に
10 結合する蛍光インターカレータから発せられる蛍光の読み取りをより高精度に行うことができる構造に整える作用等を発揮する。

即ち、検出部の反応領域に対して、好適な所定のタイミングで、所望の電場を形成したり(印加オン)、電場を形成しなかったり
20 (印加オフ)することによって、上記(1)～(3)の作用を順次発揮させることができる。

より具体的には、高周波高電圧の印加によって上記(1)の作用を得て、検出用物質と標的物質を反応し易い構造、例えばヌクレオチド鎖の塩基配列が重層されていない直鎖状構造(伸長した
25 構造)に整えることができる。

続いて、矩形波電圧(パルス状の直流電圧)を印加することに

よって、より詳細には、矩形波電圧を交互に（即ち、＋／－）印加することによって、上記（２）の作用を得て、反応領域に遊離して存在する標的物質を、検出表面に固定された状態にある検出用物質に接近させる。これにより、反応効率（反応機会）が高まるので、反応時間を短縮できる。

そして、検出の段階においても、高周波高電圧を反応領域に印加することによって、（３）の作用を得て、反応領域に存在する反応生成物からの蛍光等を、光学的手段等の検出手段によって正確に検出することができる。

10 ここで、検出用物質と標的物質のハイブリダイゼーション等の相互反応を確実に進行させるためには、物質のブラウン運動に専ら委ねることができる反応領域に形成した方がよいと考えられる。そこで、本発明では、一連の電場形成手順において、前記反
15 応領域に電場を形成しない時間を積極的に設けるようにする。即ち、前記矩形波電圧オンに続いて、矩形波電圧オフの時間を設けることによって、物質間の相互反応を促進させることができる。

ここで、本発明に係る「バイオアッセイ方法」においては、検出用物質並びに標的物質の種類を特に限定するものではない。また、「標的物質」は蛍光標識その他の標識が付されているもの、
20 付されていないものの双方を含む。「検出用物質」は、検出表面に直接的に、又はリンカーを介して間接的に固相化され、蛍光物質等により標識された標的物質と特異的な相互反応作用を発揮する低分子、高分子及び生体物質等を広く包含し、狭く解釈されない。

25 「検出表面」は、ヌクレオチド鎖等の末端を固定化できる好適な表面処理が施された表面部位を意味する。例えば、ストレプト

アビジンによって表面処理された場合には、ビオチン化されたヌクレオチド鎖の固定化に適した検出表面となる。

本方法は、本発明の目的、効果に合致する範囲において、タンパク質－タンパク質間、ヌクレオチド鎖－ヌクレオチド鎖間（DNA－DNA、DNA－RNAの双方を含む。）、タンパク質－ヌクレオチド鎖（二本鎖含む。）間その他の高分子間の相互反応、高分子と低分子の相互反応、低分子間の相互反応の全てに適用可能である。

一例を挙げれば、前記検出用物質及び前記標的物質はヌクレオチド鎖であって、前記相互反応作用がハイブリダイゼーションである場合においては、狭小な反応領域（スポット領域）でもハイブリダイゼーション効率を確実に高めることができるので、反応時間が短く、かつ読み取り精度の高いDNAチップ又はマイクロアレイ手法を新規に提供できる。

ここで、上記反応領域における物質間相互反応作用が、ハイブリダイゼーションの場合における好適なバイオアッセイ方法としては、（a）前記検出表面に末端部位が固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖を伸長させるように電場を形成する手順と、（b）前記手順後に前記反応領域に対して標的ヌクレオチド鎖を添加する手順と、（c）前記手順後に前記反応領域に電位差を生じさせて、反応領域中の検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖とを相対的に移動させる手順と、（d）前記手順後に印加をオフにした状態でハイブリダイゼーションを行う手順と、を含む方法である。以下、（a）～（d）の各手順について具体的に説明する。

ここで、本願において「ヌクレオチド鎖」とは、プリンまたは

ピリミジン塩基と糖がグリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステルの重合体を意味し、DNAプローブを含むオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドが重合したDNA（全長あるいはその断片）、逆転写により得られるcDNA（cDNAプローブ）、RNA等を広く含む。

検出表面に末端部位が固定されるべき検出用ヌクレオチド鎖（一本鎖）は必ずしも直鎖状のコンフォメーションをとっているとは限らないことから、上記（a）手順によって、検出用ヌクレオチド鎖を電気力線に沿って、直鎖状に伸長させる。これにより、反応領域に対して検出用ヌクレオチド鎖の塩基配列が露出し、相補的な塩基配列との水素結合反応が進行し易い状態を形成できる。

より詳細には、リン酸イオン等を備えるヌクレオチド鎖の陰電荷とイオン化した水素原子の陽電荷で構成される多数の分極ベクトルからなるヌクレオチド鎖が電界の印加により伸長し、このため、塩基同士が重層することが無くなり、この結果、立体障害がなくなって、近在する標的ヌクレオチドとのハイブリダイゼーション反応が円滑に行われるようになる。

ヌクレオチド鎖が伸長又は移動する原理を詳説すると、ヌクレオチド鎖の骨格をなすリン酸イオン（陰電荷）とその周辺にある水がイオン化した水素原子（陽電荷）とによってイオン曇を作っていると考えられ、これらの陰電荷及び陽電荷により生じる分極ベクトル（双極子）が、高周波高電圧の印加により全体として一方向を向き、その結果としてヌクレオチド鎖が伸長すると考えられる。加えて、電気力線が一部に集中する不均一電界が印加され

た場合、ヌクレオチド鎖は電気力線が集中する部位に向かって移動する (Seiichi Suzuki, Takeshi Yamanashi, Shin-ichi Tazawa, Osamu Kurosawa and Masao Washizu: "Quantitative analysis on electrostatic orientation of DNA in stationary AC electric field using fluorescence anisotropy", IEEE Transaction on Industrial Applications, Vol.34, No.1, P75-83 (1998)参照)。

続いて、前記 (a) 手順後に、電圧印加をオンの状態にしたままか、或いは電圧印加を一旦オフにした状態で、反応領域の液相中に標的ヌクレオチド鎖を含む試料溶液を添加する (b) 手順を実行する。

この (b) 手順に続いて、反応領域に電場を形成して、反応領域中の検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖とを相対的に移動させる上記 (c) 手順を実行し、ハイブリダイゼーションが進行し易い反応環境を形成する。即ち、(c) 手順によれば、反応領域に電場を形成することによって、従来、専らブラウン運動にのみに基づいていた両ヌクレオチド鎖間の反応機会を格段に増加させることができるので、反応効率が高まり、検出精度を向上させることができる。

次に、(d) 手順では、前記 (c) 手順終了後に、印加をオフした状態を形成し、ブラウン運動に基づくハイブリダイゼーションを行うようにする。この (d) 手順において印加オフの条件にした理由は、ハイブリダイゼーションが相補的な塩基対間の水素結合に専ら委ねられる反応だからである。

次に、本発明では、上記バイオアッセイ方法を好適に実施できるツールとして、以下の構成を備える「バイオアッセイ装置」を提供する。

即ち、本発明に係るバイオアッセイ装置は、検出用物質が固定可能なように表面処理が施された検出表面と、前記検出表面に固定された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域と、該反応領域内に電位差を生じさせることにより、該反応領域内に電場形成が可能であるとともに、前記電場形成を所定タイミングでオン／オフ可能に構成された電場形成手段と、を少なくとも備える検出部を用いる。

前記「検出部」は、検出表面と反応領域と電場形成手段、以上3つを必須構成とし、それ以外の構成、構造について特に限定されない。例えば、周辺から区画された微小なセル構造やチャンネル構造等を基板上に形成し、これらの構造部分に前記必須構成を設け、検出部としてもよい。基板上の検出部の数は、目的、用途に応じて決定でき、基板の形態は、矩形状、円盤状その他の平板状の形態を適宜選択決定することができる。

さらに、本発明では、上記バイオアッセイ方法を好適に実施できるツールとして、以下の構成を備える「バイオアッセイ基板」を提供する。

本発明に係る「バイオアッセイ用基板」は、光学的に記録情報の読み取りが可能とされた円盤状基板上に、少なくとも、(1) 検出用ヌクレオチド鎖の末端部位が固定可能な表面処理が施された検出表面、(2) 前記検出表面に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖を伸長させる電場を形成する正負電極、(3) 前記検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーション反応の場となる反応領域、を備える「検出部」が設けられている。

この「検出部」を有するバイオアッセイ基板では、検出表面に

固定された検出用ヌクレオチドに電界をかけることによって、該ヌクレオチド鎖を直鎖状に伸長させた上で、標的ヌクレオチド鎖を含むサンプル溶液を、検出部の前記反応領域を狙って正確に滴下し、検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーション反応を進行させることができる。この結果、ハイブリダイゼーション反応を短時間で効率良く行うことができるという有利な効果が得られる。

前記効果は、上述したように、リン酸イオン等を備えるヌクレオチド鎖の陰電荷とイオン化した水素原子の陽電荷で構成される多数の分極ベクトルからなるヌクレオチド鎖が、電界の印加により伸長して、塩基同士が重層することが無くなる結果、反応時の立体障害がなくなり、近在する標的ヌクレオチドと検出用ヌクレオチドとのハイブリダイゼーション反応が円滑に行われるようになることによってもたらされる。

ここで、ヌクレオチド鎖が伸長又は移動する原理を再度説明すると、ヌクレオチド鎖の骨格をなすリン酸イオン（陰電荷）とその周辺にある水がイオン化した水素原子（陽電荷）とによってイオン曇を作っていると考えられ、これらの陰電荷及び陽電荷により生じる分極ベクトル（双極子）が、高周波高電圧の印加により全体として一方向を向き、その結果としてヌクレオチド鎖が伸長すると考えられる。加えて、電気力線が一部に集中する不均一電界が印加された場合、ヌクレオチド鎖は電気力線が集中する部位に向かって移動する。

ここで、前記検出表面に電気力線が集中するような電界を印加すると、結果的に、電界により伸長処理（前述）されたヌクレオチド鎖が該検出表面に向かって移動し、その末端部位が検出表面

に衝突することによって、検出用のヌクレオチド鎖を検出表面に確実に固定することができる。

「反応領域」は、液相中でのハイブリダイゼーション反応の場を提供できる区画された領域又は空間であって、かつ上記正負電極間に電位差が生じることで、液相に電場が形成される領域である。

なお、この反応領域では、一本鎖ヌクレオチド間の相互反応、即ちハイブリダイゼーションに加え、検出用ヌクレオチド鎖から所望の二本鎖ヌクレオチドを形成し、該二本鎖ヌクレオチドとペプチド（又はタンパク質）の相互反応、酵素応答反応その他の分子間相互反応も行わせることができる。例えば、前記二本鎖ヌクレオチドを用いる場合は、転写因子であるホルモンレセプター等のレセプター分子と応答配列DNA部分の結合等进行分析することができる。

次に、本発明に係るバイオアッセイ用基板では、上記した「検出部」を、一壁面に検出表面が形成されたセル構造を備えるセル検出部とし、このセル検出部を円盤状基板上に複数配設させた形態を採用することができる。なお、「セル検出部」とは、周辺の基板領域とは区画された小室状の反応領域を備える部位と定義する。

この「セル検出部」は、基板上の適宜な位置に配設することが可能であるが、上方視放射状を呈するように並べて配設すれば、基板上のスペースを有効に利用できるのもので、情報の集積密度を高めることができる。即ち、記録情報の集積量が多い（円盤状の）DNAチップを提供できる。

また、セル検出部は、互いにコンタミネーションしないように

区画されているので、セル検出部単位又はグルーピングされた複数のセル検出部単位で、異なる検出用ヌクレオチド鎖を固定し、検出用ヌクレオチド鎖ごとに別個独立の条件を設定して、ハイブリダイゼーション反応を進行させることができる。

- 5 例えば、疾病発症のマーカー遺伝子を基板上にグルーピングして固定できる。これにより、一つの基板を用いて、同時に複数の疾病の発現状況を確認することができる。

また、 T_m 又はGC含有率の違いに基づいて、固定化する検出用ヌクレオチド鎖をグルーピングしておくことが可能となる。これにより、アクティブなハイブリダイゼーション反応が得られる
10 バッファー組成、濃度等の反応条件、洗浄条件、滴下するサンプル溶液濃度等を、検出用ヌクレオチド鎖の性質に応じてきめ細かく選択することが可能になるので、解析作業において偽陽性又は偽陰性が示される危険性を格段に減少させることができる。

- 15 次に、本発明に係るバイオアッセイ用基板では、前記検出部の反応領域を、円盤状基板上に放射状に延設された条溝内に形成又は配置し、該条溝の内壁面には、前記検出表面を配設するという構成も採用できる。

なお、基板に形成される「条溝」とは、筋状に延設された細長のマイクロチャンネル構造を意味し、この条溝を備えるバイオア
20 ッセイ用基板が属する一つの分野は、円盤状のマイクロチャンネルアレイと言える。以下、反応領域が条溝内に設けられている構成の検出部を、上記「セル検出部」にならって、便宜上「条溝検出部」と称することにする。

- 25 この「条溝検出部」を採用した場合は、毛細管現象を利用した送液や、円盤状の基板を所定の方法で回転させることによって生

じる遠心力を生かした送液方法を利用することができる。例えば、サンプル溶液や反応後にアクティブに結合しなかった余分な標的物質を除去するための洗浄液等を、基板中心領域から条溝内（即ち反応領域）に、円滑かつ確実に送液することが可能となる。

- 5 なお、条溝検出部の場合でも、前記条溝単位又はグルーピングされた複数の条溝単位に、異なる検出用ヌクレオチド鎖を固定することができる。

10 以上説明したバイオアッセイ用基板において、前記検出表面部位の位置情報と回転同期情報を提供する手段を備えた場合、前記位置情報と回転同期情報に基づいて、検出用ヌクレオチド含有溶液並びに標的ヌクレオチド含有溶液を、所定の反応領域に正確に追従させて滴下することができる。

15 前記手段は、前記基板上に設けられたウォブリングまたはアドレスピットによるものとすることができる。なお、「ウォブリング」とは、ディスク上の物理的な番地（アドレス）の情報を予めディスク上に記録するために、ユーザーによるデータを記録するグループ（案内溝）をトラックの中心に対してわずかに左右に蛇行させることである。通常、トラッキングサーボ帯域より高い周波数に対し、わずかな周波数の偏向（Deviation）を有するFM
20 変調が行われ、正弦波変調信号振幅をグループ半径方向変位として基板上に刻まれる。

25 以上説明したバイオアッセイ用基板上に設けられた上記反応領域に対しては、室温と反応至適温度との間で、ゲル、ゾルの可逆相変化が起こりえる物質（「相変化物質」と称する。）を充填することも可能である。相変化物質の一例としては、アガロースゲルを挙げることができる。

この手段では、相変化物質を高温下で前記相変化物質をゾル化し、この状態で電圧を印加してDNA等のヌクレオチド鎖を配列した後に、温度を低下させてゲル化し、更に続いてハイブリダイゼーション時には、反応至適温度条件でゾル化する手順を実行でき、ハイブリダイゼーション時において前記相変化物質をゲル状態に保持しておけば、DNA等のヌクレオチド鎖を伸長させた状態でハイブリダイゼーションさせることができるので好適である。なお、前記相変化物質がゲル化した状態のときには、標的ヌクレオチド鎖を含む試料溶液を検出部に滴下した際に、ハイブリダイゼーションがうまく進行しないおそれがあるので、電気泳動の場合と同様に、滴下ポイントに縦方向の溝を予め形成しておき、この溝の中に試料溶液を滴下してもよい。

本発明において、標的ヌクレオチド鎖は、蛍光色素で標識する手段か、インターカレータを用いる手段のいずれも採用できる。「インターカレータ」は、検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖との塩基間の水素結合中に挿入されるようにして、ハイブリダイゼーションした二本鎖ヌクレオチド鎖に取り込まれる。これにより、長波長側に蛍光波長がシフトし、かつ、蛍光強度と二本鎖ヌクレオチド鎖に取り込まれたインターカレータの量との間には相関関係があるので、この相関関係に基づいて、定量的な検出が可能になる。以上のように、本発明は、DNAチップやバイオセンサーチップに関連する新規技術を提供するという技術的意義を有している。

また、本発明は、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用できる新規なバイオアッセイ用基板を、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の

関連産業界に提供するという技術的意義を有している。

図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明に係るバイオアッセイ方法の好適な手順並び
5 に本発明に係るバイオアッセイ装置の好適な実施形態を説明す
るためのフロー図である。

第 2 図は、同バイオアッセイ方法又は装置の電圧印加のオン／
オフの手順の実施例を説明するための波形図である。

第 3 図は、本発明に係る好適な実施形態であるバイオアッセイ
10 用基板を上方視したときの外観斜視図である。

第 4 図は、基板に設けられたセル検出部の一つを拡大して示す
外観斜視図である。

第 5 図は、同セル検出部の反応領域の検出表面付近を拡大して
示す図である。

15 第 6 図は、本発明に係る好適な別の実施形態であるバイオアッ
セイ用基板を示す図であり、(A) は基板の上方視平面図、(B)
は (A) 図中の X 部の拡大平面図である。

発明を実施するための最良の形態

20 以下、添付図面に基づき、本発明の好適な実施形態について説
明する。

第 1 図 (A) ～ (F) は、本発明に係るバイオアッセイ方法の
好適な手順並びに本発明に係るバイオアッセイ装置の好適な実
施形態を説明するためのフロー図、第 2 図は、前記方法又は前記
25 装置において実施される電圧印加のオン／オフの手順の一実施
例を説明するための波形図である。

なお、以下、本発明に関し、検出用物質と標的物質が双方一本鎖のヌクレオチド鎖であって、相互反応作用がハイブリダイゼーションである場合を代表例として説明する。なお、この説明を根拠として、検出用物質と標的物質がヌクレオチド鎖に限定されることはなく、また、本発明の対象となる相互反応作用がハイブリダイゼーションに限定されることはない。

まず、本発明に係るバイオアッセイ方法又は装置は、第1図中に符号Dで示された検出用物質が固定可能なように表面処理が施された検出表面Sと、この検出表面Sに固定され状態の検出用物質Dと添加された標的物質Tとの相互反応作用の場を提供する反応領域Rと、この反応領域R内に電位差を生じさせて、該反応領域R内に電位差を生じさせる電場形成手段Eとして機能する正電極E1、負電極E2とを少なくとも備える検出部1を利用することを前提としている。なお、符号2は、前記検出部1を備える基板の一部を表しており、符号Vは、正電極E1、負電極E2に通電する電源である。

第1図(A)は、前記検出表面Sに対して、一本鎖の検出用ヌクレオチド鎖(例えば、DNAプローブ)D1の末端部位が固定されている状態を簡潔に表している。この状態では、検出用ヌクレオチド鎖D1の高次構造は、直鎖状ではなく、例えば、第1図(A)のように鎖が絡み合った如き重層状の形態をとっていることが多い。このため、すべての塩基配列が反応領域Rに露出しているとは限らないから、反応領域Rに後に添加される標的ヌクレオチド鎖Tとの効率の良いハイブリダイゼーションは得難い状態にあると考えられる。

そこで、本発明では、正電極E1と負電極E2との間にある反

応領域 R の液相（塩溶液など）に、高周波高電圧を印加して、反応領域 R 中に電位差を生じさせて、電場（電界）を形成する。この電場は、検出用ヌクレオチド鎖 D 1 を電界に沿って直鎖状（直線状）に伸長させる作用を発揮する。この結果、検出用ヌクレオチド鎖 D 1 が伸長した状態（符号 D 2 で示す。）となり、検出用ヌクレオチド鎖 D 1 の塩基配列が液相に露出する（第 1 図（B）参照）。

次に、高周波高電圧の印加を一旦オフするか、又はオンした状態で、所定構造のノズル 3 からの確に反応領域 R に標的物質 T（標的ヌクレオチド鎖 T 1）を含む試料溶液を添加する。標的ヌクレオチド鎖 T 1 は、添加当初、第 1 図（C）に示されているように、必ずしも直鎖状ではないが、高周波電圧が印加された液相では、第 1 図（D）に示されているように、直鎖状に伸長した状態（符号 T 2 で示す。）となり、同様に直鎖状とされた検出用ヌクレオチド鎖 D 2 と相補鎖を形成し易い状態となる。

次に、矩形波電圧の印加のオン／オフを数回繰り返すことによって、両ヌクレオチド鎖 D 2、T 2 を段階的に接近させたり、あるいは標的ヌクレオチド鎖を前後に移動させたり、更には、反応のタイミングを調整したりする。

矩形波電圧の印加をオフする理由は、直鎖状の標的ヌクレオチド鎖 T 2 と直鎖状の検出用ヌクレオチド鎖 D 2 との間の相補鎖形成反応、即ちハイブリダイゼーションを、専らブラウン運動に委ねて進行させるためである。なお、第 1 図（E）は、両鎖 D 2、T 2 の相補的な塩基配列部分が水素結合して、二本鎖となった状態の反応生成物（D 2 + T 2）を簡略に表している。

なお、本発明では、検出用ヌクレオチド鎖 D 1（D 2）と相補

的な塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖 T 1 (T 2) の検出を行う目的以外に、上記手順を利用して、目的とする二本鎖ヌクレオチド鎖 (DNA) を作製し、転写因子等の特定のタンパク質と前記二本鎖ヌクレオチド鎖 (DNA) 中の特定応答配列部分との
5 相互反応作用を検出する方法、更にこの方法を利用した内分泌攪乱物質の探索、検定等に展開してもよい。

第 1 図 (F) は、光学的手段 4 に基づいて、標識 (例えば、蛍光標識) された標的ヌクレオチド鎖 T 2 を検出、読み取る手順を表しており、本発明においては、標識方法は狭く限定されること
10 はない。例えば、蛍光インターカレータを用いてもよい。蛍光インターカレータは、検出用ヌクレオチド鎖 D と標的ヌクレオチド鎖 T との塩基間の水素結合中に挿入されるように、ハイブリダイゼーションした二本鎖ヌクレオチド鎖に取り込まれる。これにより、長波長側に蛍光波長がシフトし、かつ、蛍光強度と二本鎖 DNA
15 に取り込まれた蛍光インターカレータの量との間の相関関係に基づいて、定量的な検出が可能になる。蛍光インターカレータに用いる蛍光色素としては、POPO-1 や TOPO-3 等が考えられる。

検出段階においては、高周波高電圧を印加することによって、
20 反応領域 R に形成されている反応生成物 (二重鎖ヌクレオチド鎖) の高次構造を重層にない構造に整えることにより、光学的手段 4 によって正確に検出することができる。

続いて、第 2 図に基づいて、印加オン／オフ手順の一実施例について説明する。なお、この実施例は、第 1 図 (C) 以降の手順
25 に対応している。

<ステップ a>

高周波高電圧の印加により形成される電界下にヌクレオチド鎖を置くことによって、該ヌクレオチド鎖の誘導分極を図り、これによりヌクレオチド鎖を伸長させる。そこで、本ステップ a では、高周波高電圧を印加することにより、標的ヌクレオチド鎖 T 1 を伸長させ、同様に検出用ヌクレオチド鎖 D 1 についても伸長させる（第 1 図（C）、第 1 図（D）に示された状態を参照）。

なお、前記高周波高電圧は、 $1 \times 10^6 \text{V/m}$ 、約 1MHz 付近が好適条件と考えられる（Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172 (1990)参照）。

<ステップ b>

両ヌクレオチド鎖 D 2, T 2 が相対的に移動し、接近したと思われるタイミングで、電圧の印加をオフし、専らブラウン運動に基づいてハイブリダイゼーションを進行させる（第 1 図（E）に示された状態を参照）。

<ステップ c>

+ 方向へ矩形波電圧の印加をオンして、依然として未接近状態にある標的ヌクレオチド鎖 T 2 を、クーロン力で移動させることによって、検出用ヌクレオチド鎖 D 2 とのハイブリダイゼーションに適した位置とする（第 1 図（D）の状態から第 1 図（E）の状態へ移行する過程を参照）。

<ステップ d>

再び電圧の印加をオフし、専らブラウン運動に基づいてハイブリダイゼーションを進行させる（第 1 図（E）の状態を参照）。

<ステップ e>

次に、一方向へ矩形波電圧の印加をオンして、依然として未接近状態にある標的ヌクレオチド鎖 T 2 の移動を行う（第 1 図（D）の状態から第 1 図（E）の状態へ移行する過程を参照）。

<ステップ f>

- 5 再び電圧の印加をオフし、専らブラウン運動に基づいてハイブリダイゼーションを進行させる（第 1 図（E）に示された状態を参照）。

<ステップ g>

- 10 再び+方向へ高矩形波電圧の印加をオンして、依然として未接近状態にある標的ヌクレオチド鎖 T 2 の移動を行う（第 1 図（D）の状態から第 1 図（E）の状態へ移行する過程を参照）。

<ステップ h>

- 15 再び電圧の印加をオフし、専らブラウン運動に基づいてハイブリダイゼーションを進行させる（第 1 図（E）に示された状態を参照）。

<ステップ i>

再び一方向へ矩形波電圧の印加をオンして、依然として未接近状態にある標的ヌクレオチド鎖 T 2 の移動を行う（第 1 図（D）の状態から第 1 図（E）の状態へ移行する過程を参照）。

- 20 <ステップ j>

再び電圧の印加オフにし、専らブラウン運動に基づいてハイブリダイゼーションを進行させる（第 1 図（E）に示された状態を参照）。

<ステップ k>

- 25 ハイブリダイゼーションによる反応生成物である二本鎖ヌクレオチド鎖（D 2 + T 2）を、高周波高電圧下で伸長させて、蛍

光読み取りにかける（第 1 図（F）を参照）。

なお、以上説明した矩形波電圧等の印加オン／オフの手順は、
取り扱う反応生成物の種類に応じて、好適な手順、タイミングを
選択、決定できるのであって、上記手順、タイミングに限定され
5 ない。また、目的に応じて、周波数、電圧の大きさも適宜決定す
ることができる。

続いて、本発明で採用できるバイオアッセイ用基板及び該基板
に関連するバイオアッセイ装置について説明する。

第 3 図は、所定構成の検出部が多数配設されたバイオアッセイ
10 用基板の外観斜視図、第 4 図は、同基板に設けられた「検出部」
の好適な実施形態の拡大外観図である。なお、本発明で採用でき
る基板は、図示された形態に限定されない。

まず、第 3 図に示されたバイオアッセイ用基板 2（以下、「基
板 2」と略称）は、CD、DVD、MD等の光情報記録媒体に用
15 いられる円盤基板（ディスク）に採用される基材から形成されて
いる。即ち、基板 2 は、光学的に記録情報の読み取りが可能とさ
れている。

前記基材は、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリ
スチレンその他の円盤状に成形可能な合成樹脂、好ましくは射出
20 成形可能な合成樹脂によって円盤状に形成されている。なお、安
価な合成樹脂基板を用いることで、従来使用されていたガラスチ
ップに比して低ランニングコストを実現できる。基板 2 の中心に
は、基板を回転する場合に試用されるスピンドル固定用の孔（図
示せず）が形成される場合もある。

25 この基板 2 の一方の表面には、反射膜である厚さ 40 nm 程度
のアルミ蒸着層が形成されており、該層は反射膜として機能して

いる。この反射膜は、屈折率 1.5 以上の基盤単体からの表面反射 4 % 以上とする。この反射膜の上層には、透明なガラスや透明樹脂等からなる光透過層が成膜されている。

5 なお、基材が高反射率の材料である場合には、基材表面自体が
反射面として機能するので前記反射膜は形成しなくてもかまわ
ない。金属膜などの高反射率膜を形成すれば蛍光標識された標的
物質の蛍光強度を、感度良く検出することができる。以上説明し
た基板 2 の材質や層構造は、後述する基板 20（第 6 図参照）に
おいても同様である。

10 前記光透過層には、基板 2 の中心の周辺領域から上方視放射状
に延びるように、検出部 1 が多数配設されている。第 4 図は、こ
のセル検出部 1 の一つを拡大して示す外観斜視図である。なお、
以下の検出部 1 に係わる説明は、検出用物質と標的物質が共に一
本鎖のヌクレオチド鎖である場合を代表例とするが、検出部 1 の
15 対象反応物質をこれに限定する趣旨ではない。

ここで、検出部 1 には、符号 D で示す検出用ヌクレオチド鎖の
末端部位が固定できるように表面処理が施されている検出表面
S と、該検出表面 S に予め固定された前記検出用ヌクレオチド鎖
D を伸長させる電場を形成するための正電極 E 1 並びに負電極
20 E 2 と、前記検出用ヌクレオチド鎖 D と標的ヌクレオチド鎖 T と
の間のハイブリダイゼーション反応の場となる反応領域 R とを
備えている。ここでは、反応領域 R は、上方に開口する上方視矩
形状のセル、例えば、深さ 1 μ m、長さ 100 μ m、幅 50 μ m の
セルとして形成されているが、図示された形状、サイズに限定さ
25 れない。

検出表面 S は、負電極 E 2 側の反応領域 R 側に対向する内壁面

部位に形成されている。この検出表面 S は、検出用ヌクレオチド鎖 D の末端がカップリング反応等の化学結合によって固定されるように表面処理されている。

5 即ち、検出表面 S は、DNA プローブ等の検出用ヌクレオチド鎖 D の予め加工された末端部位を固定化するのに好適な表面処理が施されていればよいのであって、狭く限定されない。一例を挙げれば、ストレプトアビジンによって表面処理された検出表面 S の場合には、ビオチン化されたヌクレオチド鎖末端の固定化に適している。

10 ここで、検出表面 S に対する検出用ヌクレオチド鎖を固定するための好適な方法を説明すると、反応領域 R に不均一電界を印加することによって、該電界の作用で得られた（反応領域 R に遊離している状態の）検出用ヌクレオチド鎖が、前記電気力線が集中する検出表面 S 部分に向かって移動し、その末端部位が検出表面
15 S に衝突することになる。これにより、該ヌクレオチド鎖を検出表面 S に確実に固定することができる。この方法を好適に実行するために、負電極 E 2 は、第 4 図に示すように櫛形とする。なお、第 4 図の符号 V は、正電極 E 1，負電極 E 2 に通電する電源である

20 ここで、第 4 図中の符号 4 は、試料溶液 5 を滴下するノズルの先端部を示している。ノズル 4 は、基板 2 から提供される位置情報と回転同期情報に基づいて、検出用ヌクレオチド鎖 D を含有する試料溶液 5 並びに標的ヌクレオチド鎖 T を含有する試料溶液 5' を、反応領域 R 位置に正確に追従して滴下する構成とされて
25 いる。

滴下手段としては、インクジェットプリンティング方法を好適

に採用することができる。その理由は、所定の反応領域 R 部位に正確に追従して、微小滴を、正確に滴下することができるからである（後述する基板 20 でも同様）。

「インクジェットプリンティング法」は、インクジェットプリンターで用いられるノズルを応用する方法であって、電気を用いてインクジェットプリンターのようにプリンターヘッドから基板に検出用物質を噴射し、固定する方法である。この方法には、圧電式インクジェット法、バブルジェット（登録商標）法、超音波ジェット法がある。

- 10 圧電式インクジェット法は、圧電体にパルスを印加することによって生じる変位の圧力によって液滴を飛ばす方法である。バブルジェット（登録商標）法は、熱方式であって、ノズル中のヒーターを熱して発生させた気泡の圧力によって液滴を飛ばす方式である。ノズル内にヒーターとなるシリコン基板を埋め込み、約
- 15 300℃/s で制御して一様な気泡を作成し、液滴を押し出す。しかしながら、高温に液体が曝されることになることから、生体物質試料に用いる際には注意を要する。超音波ジェット法は、超音波ビームを液体の自由面に当てて、局所的に高い圧力を与えることによってその箇所から小滴を放出させる方式である。ノズル
- 20 を必要とせず、高速で直径約 1 μ m の小滴を形成できる。

- 本発明においては、「インクジェットプリンティング法」として、「圧電式インクジェット法」を好適に採用できる。印加するパルスの形状を変えることによって、液滴（微小滴）のサイズを制御することができるので、解析精度向上に好適である。
- 25 液滴表面の曲率半径が小さいときは液滴を小さくし、液滴の曲率半径が大きいときは、液滴を大きくすることができる。また、パ

ルスを急激に負の方向に変化させることにより液滴表面を内側に引っ張り、曲率半径を小さくすることも可能である。

ここで、前記反応領域 R に滴下された検出用ヌクレオチド鎖 D の多くは、塩基が重層した状態で検出表面 S に固定されているので（第 1 図（A）参照）、後から滴下された標的ヌクレオチド鎖 T とのハイブリダイゼーションの際には、立体障害の問題等が発生し、反応効率が良くない。

そこで、本発明に係るバイオアッセイ方法に基づき、検出部 1 に配設された上記正負電極 E 1, E 2 に通電し、反応領域 R に電位差を生じさせることによって、反応領域 R に貯留されている液相（塩溶液）に電場を形成し、該電場の電界の向きに沿って検出用ヌクレオチド鎖 D 並びに標的ヌクレオチド鎖が直鎖状（直線状）に伸長する作用を得る。

直鎖状とされた検出用ヌクレオチド鎖 D と例えば蛍光色素等によって標識された標的ヌクレオチド鎖 T との塩基間の水素結合（相補結合）は、立体障害等が少なくなるので、相補性のある塩基配列同士が接近し易くなり、効率良く進行することになる。

即ち、検出用ヌクレオチド鎖 D と前記標的ヌクレオチド鎖 T とのハイブリダイゼーション反応が効率良く進行するという結果が得られる。この結果、ハイブリダイゼーションの反応時間が短縮されるとともに、読み取り時において擬陽性又は偽陰性を示す確率も減少するという好ましい結果が得られる。

ここで、第 5 図は、検出部 1 の反応領域 R の検出表面 S 付近を拡大して示す模式図である。この第 5 図では、検出表面 S にその末端部位が固定された検出用ヌクレオチド鎖 D と該検出用ヌクレオチド鎖 D の塩基配列と相補性のある塩基配列を備える標的

ヌクレオチド鎖 T がハイブリダイゼーションし、二重鎖を形成している状態が模式的に表されている。

反応領域 R（後述する反応領域 R' についても同様。）に対しては、室温と反応至適温度との間で、ゲル、ゾルの可逆相変化が起こりえるアガロースゲル等の相変化物質（図示せず。）を充填することも可能である。この実施形態では、前記相変化物質を高温下で前記相変化物質をゾル化し、この状態で電圧を印加して DNA 等のヌクレオチド鎖を配列した後に、温度を低下させてゲル化し、更に続いてハイブリダイゼーション時には、反応至適温度条件でゾル化する手順を行うことができるという利点がある。また、
5
10
ハイブリダイゼーション時において前記相変化物質をゲル状態に保持しておけば、DNA 等のヌクレオチド鎖を伸長させた状態でハイブリダイゼーションさせることができるので好適である。

なお、前記相変化物質がゲル化した状態のときには、標的ヌクレオチド鎖 T を含む試料溶液 5' を検出部 1 に滴下した際に、ハイブリダイゼーションの進行がうまくいかないおそれがあるので、電気泳動の場合と同様に、滴下ポイントに縦方向の溝を予め形成しておき、この溝の中に試料溶液を滴下してもよい。

ここで、標的ヌクレオチド鎖 T は、蛍光色素で標識してもよく、
15
20
インターカレータを用いてもよい。インターカレータは、検出用ヌクレオチド鎖 D と標的ヌクレオチド鎖 T との塩基間の水素結合中に挿入されるように、ハイブリダイゼーションした二本鎖ヌクレオチド鎖に取り込まれる。これにより、長波長側に蛍光波長がシフトし、かつ、蛍光強度と二本鎖 DNA に取り込まれたインターカレータの量との間の相関関係に基づいて、定量的な検出が
25
可能になる。インターカレータとして用いる蛍光色素としては、

P O P O - 1 や T O T O - 3 等が考えられる。

これは、例えば、所定の細胞等から抽出された試料溶液 5' 中に、特定の疾病が起こると発現することが知られているマーカー遺伝子を含む検出用ヌクレオチド鎖 D と相補性を有する標的ヌクレオチド鎖が存在するという事実が認識でき、その結果、前記
5 細胞には前記疾病が発生していることが予測されることになる。

なお、基板情報の読み取りは、基板 2 にレーザー光（例えば、青色レーザー光）を照射して各反応領域 R を励起させ、蛍光強度の大きさを検出器（図示せず。）によって検出し、検出用ヌクレ
10 オチド鎖 D と標識された標的ヌクレオチド鎖の間の結合反応状況を判断する。最後に、各反応領域 R に対する蛍光強度を、A/D 変換して結合反応割合をコンピュータ C の画面に分布表示することによって、視覚化する（後述の基板 20 でも同様）。

次に、第 6 図を参照して、本発明で用いることができる基板の
15 第 2 実施例について説明する。第 6 図（A）は、第 2 実施例である基板 20 の上方視平面図、第 6 図（B）は、第 6 図（A）中の X 部の拡大平面図、である。

第 6 図に符号 20 で示された基板は、条溝検出部 10 を備える。
この検出部 10 は、反応領域 R' が円盤状基板の上に放射状に延
20 びる条溝状に形成され、該条溝を形成する長手方向の片側の内壁面 Y には、上記検出部 1 の検出表面 S と同様の構成を備える検出表面 S' が、所定間隔で配設されている。また、検出表面 S' が形成された各部位には、反応領域 R' を挟むように正負電極 E 3、E 4 が対設されている（第 5 図（B）参照）。なお、条溝検出部
25 10 は、セル状の上記検出部 1 が条溝内に配列された構成とも言える。

正電極 E 3, E 3・・・は、共通電極化することができ、同様に、電極 E 4, E 4・・・についても共通電極化できる。即ち、反応領域 R' を挟んで対向するように、共通電極である正電極 E 3 と負電極 E 4 を並設することができる。この構成では、針状のプロ
5 ープを正電極 E 3 と負電極 E 4 に上方から押し当てることによって、通電させることができる。

反応領域 R' は、各条溝内に配列形成したピット（図示せず）に形成してもよい。このピット内の反応領域に微小滴を滴下することによって、ほぼ同一のスポットサイズを実現し、再現性の良
10 い蛍光強度検出を実現できる。

また、上記構成の条溝検出部 10 を採用した場合は、毛細管現象を利用した送液や、円盤状の基板を所定の方法で回転させることによって生じる遠心力を生かした送液手段も利用することができる。

15 具体的には、基板 20 の中央部に液溜部 21 を設け、この液溜部 21 に、試料溶液 5（5'）（第 4 図参照）や反応後にアクティブに結合しなかった余分な標的物質を除去するための洗浄液等を注入し、基板 20 を回転させることによって、基板中心領域から条溝内（即ち反応領域 R'）に、円滑かつ確実に送液すること
20 ができる。

上記基板 2 の検出部 1 又は基板 20 に設けられた条溝検出部 10 のいずれの場合でも、検出部単位又はグルーピングされた複数の検出部単位に、異なる検出用物質 D を固定することができる。

ここで、基板 2（20）の位置情報及び回転同期情報について
25 簡潔に説明しておくことにする。基板 2（20）の回転方向には、予め光ディスクマスタリングプロセスにより形成された多数の

アドレスピットが形成されている。基板 2 (20) を光ディスクとして考えた場合、滴下検出位置である反応領域 R (R') をユーザーデータ領域と考え、他の領域は、サンプルサーボ方式等により同期ピットを配列し、かつトラッキングサーボとしても利用し、更に、直後にアドレス部（ディスク上の地理的な番地）を挿入することによって位置情報を与える。

アドレス部は、先頭パターンであるセクターマークから始まり、実際に回転しているディスクの回転位相を与える V F O (Variable Frequency Oscillator) とアドレスデータの開始位置を与えるアドレスマークとトラックとセクタのナンバーが入った I D (Identifier) などが組み合わされてなる。

上記構成の基板 2 (20) を用いてバイオアッセイを行うためには、少なくとも次の手段及び機構を備える装置を使用するのが好適である。即ち、前記基板 2 (20) を回転可能に保持する基板回転手段と、この基板回転手段によって、前記基板 2 (20) を回転させながら検出用ヌクレオチド鎖含有溶液 5 並びに標的ヌクレオチド鎖含有溶液 5' を反応領域 R (R') に対して、所定の順序、タイミングで滴下する滴下手段と、該滴下手段（のノズル）と基板 2 (20) との間の距離を一定に保持するためのフォーカスサーボ機構と、基板 2 (20) から提供される位置情報と回転同期情報に基づいて、前記溶液 5, 5' の滴下を基板 2 (20) の反応領域 R (R') に追従させるトラッキングサーボ機構を少なくとも備えている装置（図示せず。）である。

なお、上記アドレスピットを用いる代わりにトラック上にウォブリングを形成し、位置に応じたクロック情報を持たせるようにウォブリングの蛇行を調節して、ディスク上の位置情報を取得し

てアドレッシングを行うようにしても良い。同時に、ウォブリング周波数成分を利用することでトラッキングサーボを行うことが出来る。さらに、アドレスピットとウォブリングを併せて形成することにより、より高精度のアドレッシングおよびトラッキングサーボが可能となる。

以上説明した基板 2, 20 及びこれらを用いるバイオアッセイ装置を採用すれば、既述した本発明に係るバイオアッセイ方法を好適に実施することができる。

特に、上述したバイオアッセイ基板によれば、次のような特有の効果をを得ることができる。

すなわち、従来の DNA チップ技術では、該 DNA チップ自体の集積数、集積密度が少なかったので、一度のアッセイで達成できる解析量が充分とは言えず、検出用物質の種類と数、更にはその基板上における配置分け（グルーピング）を、ユーザーが自由に設定することが困難であった。

また、従来の DNA チップでは、基板表面に予め固定され、検出用として用いられるヌクレオチド鎖は、必ずしも直鎖状に保持されているわけではないことから、立体障害等によって、標的ヌクレオチドとのハイブリダイゼーション反応の精度にばらつきがあり、反応にも長時間を要していた。

更には、 T_m (melting Temperature) 又は GC 含有率が揃っていない DNA プローブが二次元の平面的な広がりを持つ基板表面上に検出用物質が配列された構成の従来の DNA チップにおいては、同一のハイブリダイゼーション条件、洗浄条件に晒されて偽陽性又は偽陰性を示す危険性が高いという問題があった。

これと比較して、本発明に係るバイオアッセイ基板によれば、

次のような優れた効果を得ることができる。

(1) 本発明に係るバイオアッセイ用基板は、多量・多数の検出部を形成できるので情報の集積量が多い。

(2) 検出部の検出表面に固定された検出用ヌクレオチドに電
5 界をかけることによって、該ヌクレオチド鎖を直鎖状に伸長させ
た上で、標的ヌクレオチド鎖を含むサンプル溶液を、検出部の前記
反応領域を狙って正確に滴下し、検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌ
クレオチド鎖との間のハイブリダイゼーション反応を進行させる
構成であるので、ハイブリダイゼーション反応を短時間で効率
10 良く行うことができる。

(3) 検出部単位又はグルーピングされた検出部単位で、至適
な反応条件等を選択してアッセイを行うことができるので、偽陽
性、偽陰性の結果の発生率を格段に減少させることができる。従
って、前記バイオアッセイ用基板によれば、網羅的かつ効率的で、
15 しかも高精度な解析を行うことができ、記録情報当りのコストも
安価である。

(4) 本発明に係るバイオアッセイ用基板は、DNAチップや
バイオセンサーチップとして、特に有用である。また、新規構造
を備える円盤状のマイクロチャネルアレイを提供できる。本基板
20 をDNAチップとして利用する場合は、遺伝子の変異解析、SNP
s (一塩基多型) 分析、遺伝子発現頻度解析等に利用でき、創
薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において
広範囲に活用できる。

25 産業上の利用可能性

本発明は、次のような特有の効果を奏することができる。

(1) 本発明に係るバイオアッセイ方法又はバイオアッセイ装置では、検出部に設けられた反応領域の電場形成のタイミングをコントロールすることによって、前記反応領域における検出用物質と標的物質の相互反応作用の反応効率を高めることができ、反応のタイミングを制御することができる。

(2) DNAチップやバイオセンサーチップに基づくバイオアッセイ方法に特に有用であり、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用でき、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用でき、更には、抗原抗体反応の検査、内分泌攪乱物質の検定等に利用できる。

請求の範囲

1. 検出用物質が固定可能なように表面処理が施された検出表面と、
 - 5 前記検出表面に固定された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域と、
前記反応領域内に電位差を生じさせて、該反応領域内に電場を形成する電場形成手段と、
を少なくとも備える検出部において物質間の相互反応作用を
10 検出する方法であって、
前記電場形成手段による電場形成を、所定タイミングでオン／オフする手順を少なくとも含むことを特徴とするバイオアッセイ方法。
 2. 前記検出用物質及び前記標的物質はヌクレオチド鎖であつて、前記相互反応作用がハイブリダイゼーションであることを特徴とする請求の範囲第1項記載のバイオアッセイ方法。
 3. 前記検出表面に末端部位が固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖を伸長させるように電場を形成する手順と、
前記手順後に前記反応領域に対して標的ヌクレオチド鎖を添
20 加する手順と、
前記手順後に前記反応領域に電場を形成し、反応領域中の検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖とを相対的に移動させる手順と、
前記手順後に印加をオフにした状態でハイブリダイゼーションを行う手順と、を含む請求の範囲第2項記載のバイオアッセイ
25 方法。

4. 検出用物質が固定可能なように表面処理が施された検出表面と、

前記検出表面に固定された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域と、

5 前記反応領域内に電位差を生じさせることにより、該反応領域内に電場形成が可能であるとともに、前記電場形成を所定タイミングでオン／オフ可能に構成された電場形成手段と、

を少なくとも備える検出部を用いることを特徴とするバイオアッセイ装置。

10 5. 光学的に記録情報の読み取りが可能とされた円盤状基板の上に、

少なくとも次の(1)～(3)を備える検出部が設けられたことを特徴とするバイオアッセイ用基板。

15 (1) 検出用ヌクレオチド鎖の末端部位が固定可能に表面処理が施された検出表面。

(2) 前記検出表面に固定された状態の前記検出用ヌクレオチド鎖を伸長させる電場を形成する正負電極。

(3) 前記検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーション反応の場となる反応領域。

20 6. 前記検出部は、前記検出表面が一壁面に形成されたセル検出部であって、該セル検出部が前記円盤状基板上に複数配設されたことを特徴とする請求の範囲第5項記載のバイオアッセイ用基板。

25 7. 前記セル検出部は、前記円盤状基板上に、上方視放射状を呈するように配設されたことを特徴とする請求の範囲第3項記載のバイオアッセイ用基板。

8. 前記セル検出部単位又はグルーピングされた複数のセル検出部単位に、異なる検出用ヌクレオチド鎖が固定されたことを特徴とする請求の範囲第7項記載のバイオアッセイ用基板。

5 9. 前記検出部の反応領域は、円盤状基板上に放射状に延設された条溝内に設けられ、該条溝の内壁面には、前記検出表面が配設されたことを特徴とする請求の範囲第5項記載のバイオアッセイ用基板。

10 10. 前記条溝単位又はグルーピングされた複数の条溝単位に、異なる検出用ヌクレオチド鎖が固定されたことを特徴とする請求の範囲第9項記載のバイオアッセイ用基板。

11. 前記検出表面部位の位置情報と回転同期情報を提供する手段を備えることを特徴とする請求の範囲第5項記載のバイオアッセイ用基板。

15 12. 前記手段は、前記基板上に設けられたウォブリングまたはアドレスピットによることを特徴とする請求の範囲第11項記載のバイオアッセイ用基板。

13. 前記反応領域に対して、室温と反応至適温度との間で、ゲル、ゾルの可逆相変化が起こりえる物質を充填したことを特徴とする請求の範囲第5項記載のバイオアッセイ用基板。

20 14. インターカレータを用いて前記ハイブリダイゼーション反応を検出することを特徴とする請求の範囲第5項記載のバイオアッセイ用基板。

Fig.1

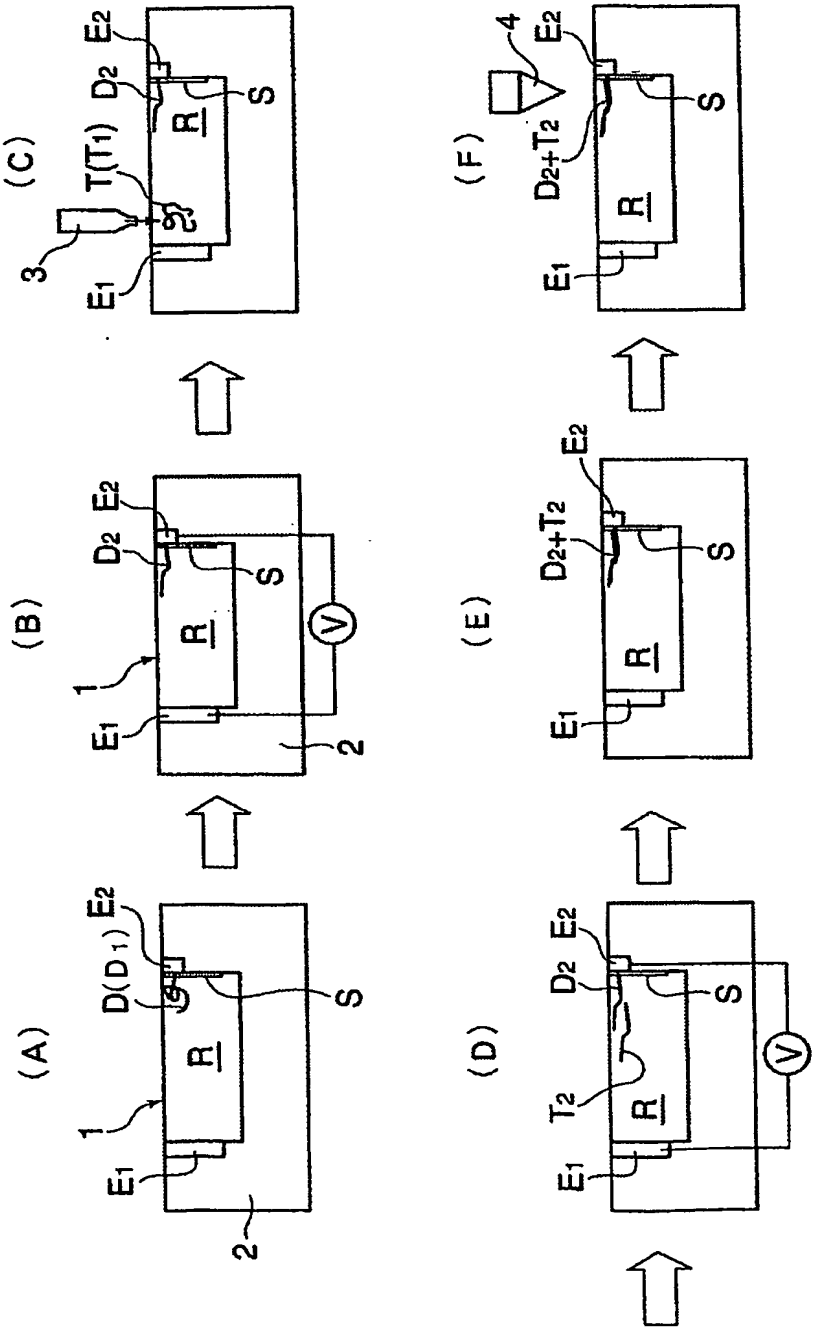
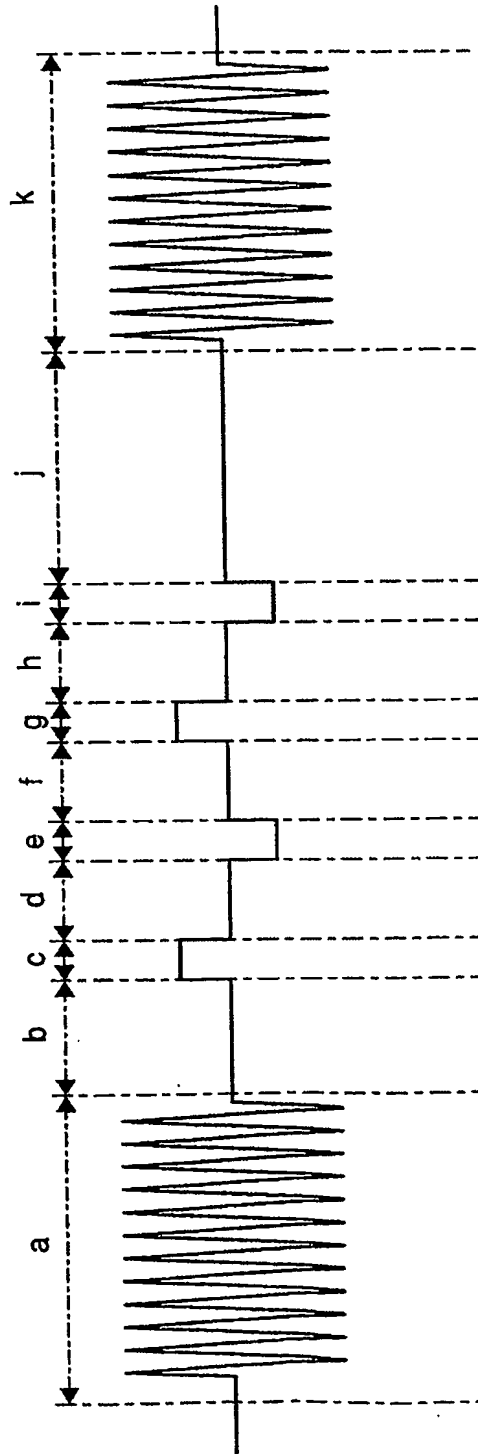


Fig.2



3/6

Fig.3

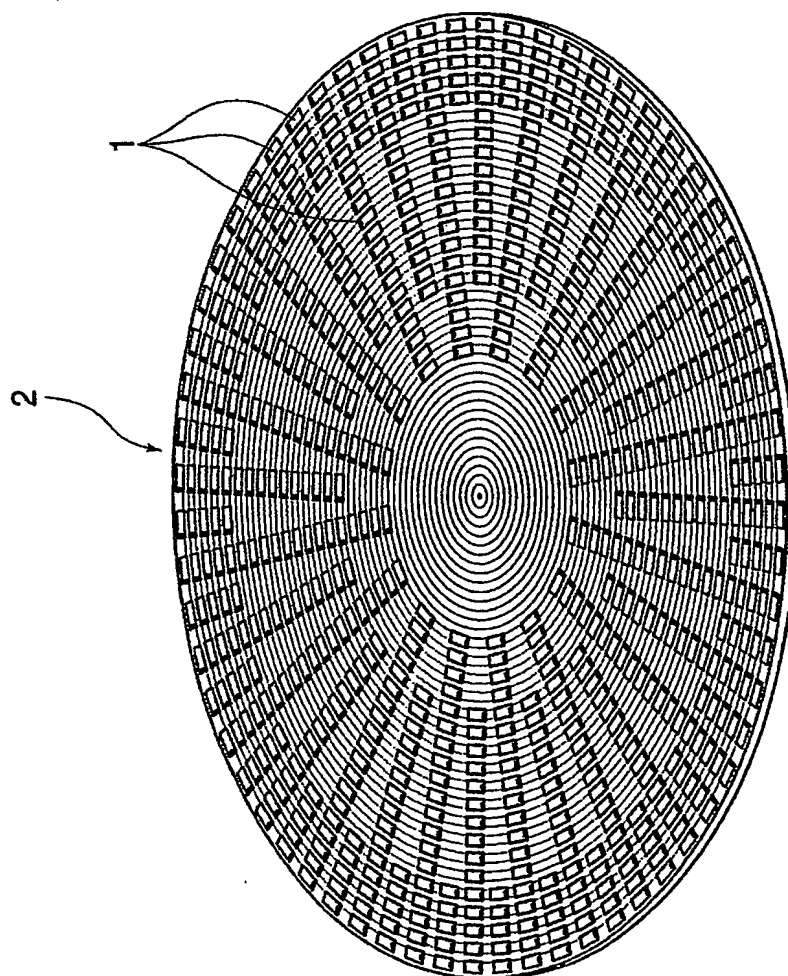


Fig.4

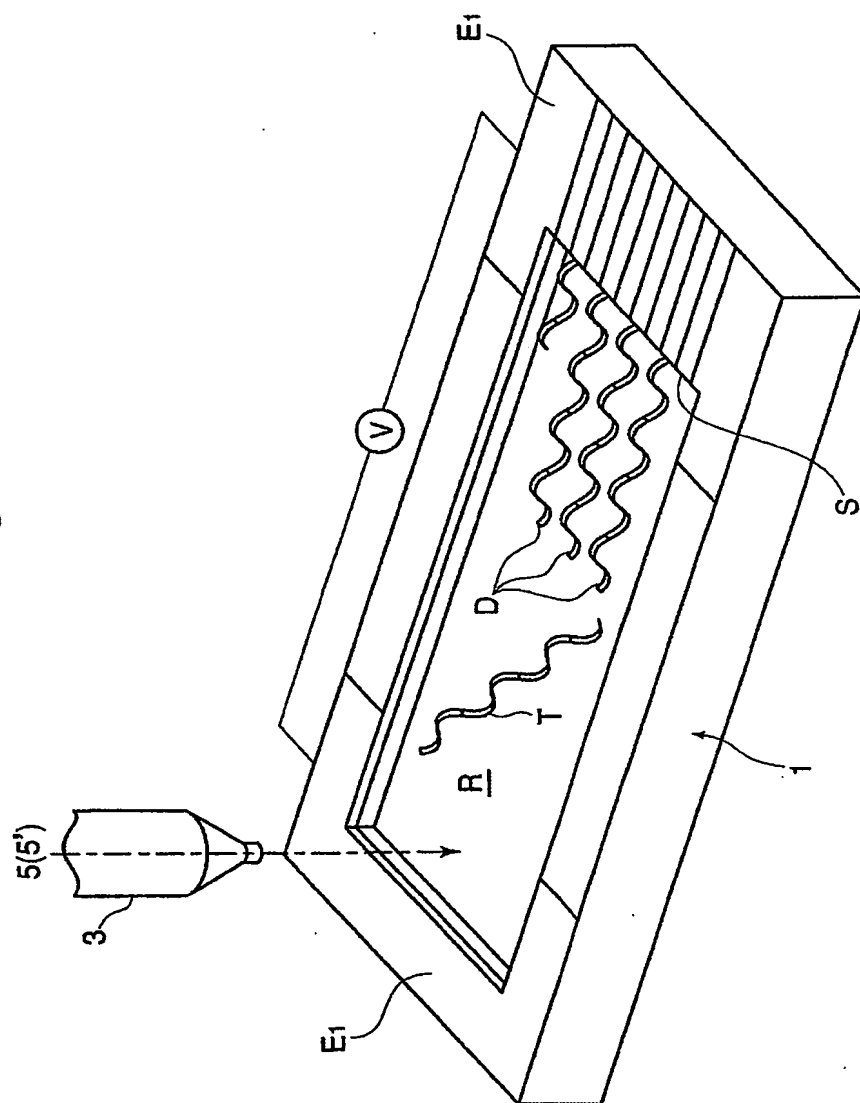
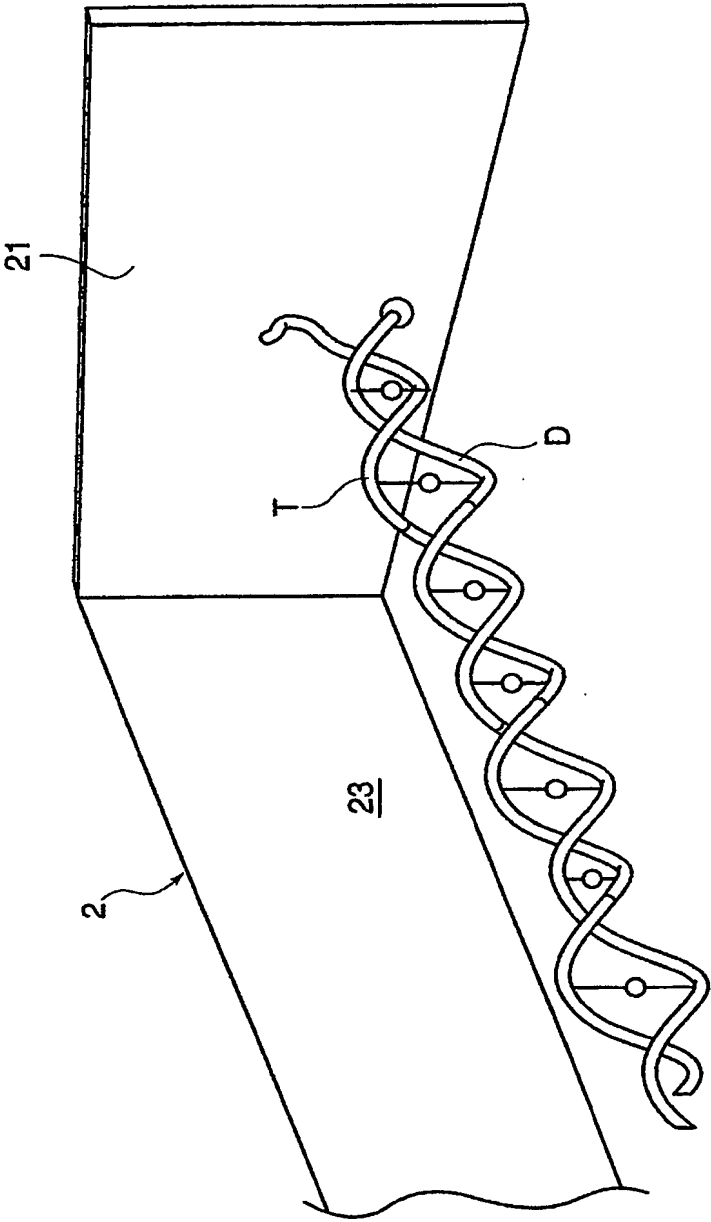
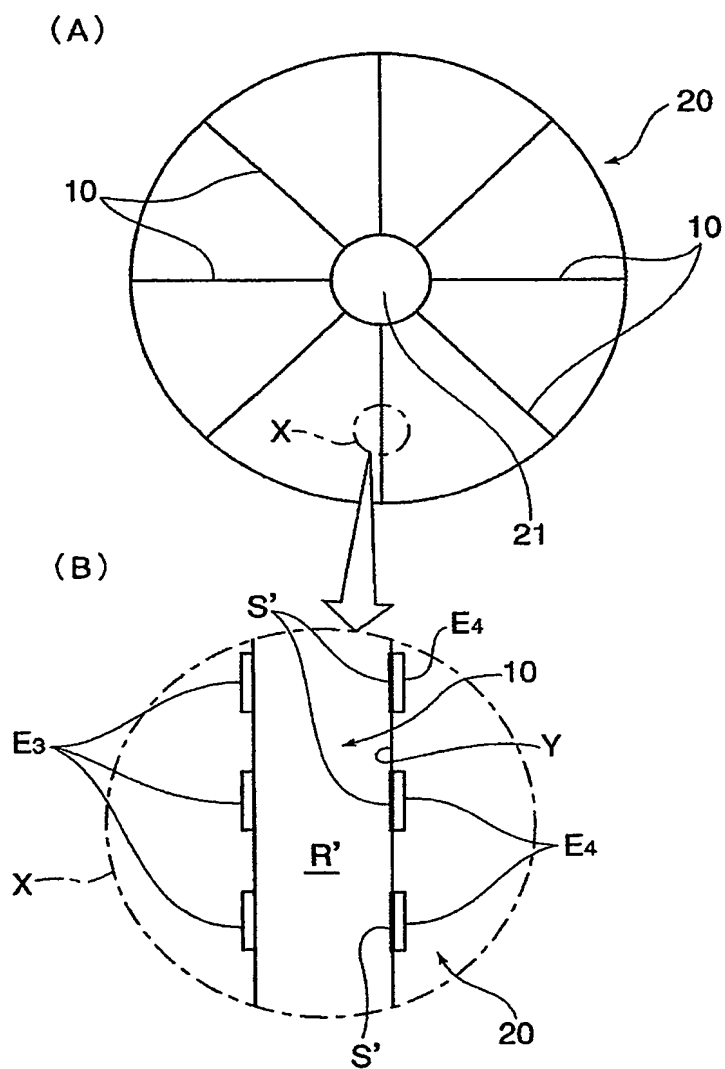


Fig.5



6/6

Fig.6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06341

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2000-060554 A (Hitachi, Ltd.), 29 February, 2000 (29.02.00), & US 6183970 A	1, 2 3-14
X Y	JP 11-512605 A (Nanogen Inc.), 02 November, 1999 (02.11.99), & WO 95/12808 A & US 5605662 A & WO 97/12030 A & EP 764322 A & BR 9506035 A & FI 970957 A & CN 1164894 A & CA 2259406 A	1, 2 3-14
Y	Masao WASHIZU et al., "Electric Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRY APPLIC ATIONS, Vol.26, No.6, pages 1165 to 1172, (1990)	3-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 August, 2003 (26.08.03)

Date of mailing of the international search report
09 September, 2003 (09.09.03).

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06341

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-238674 A (Nikon Corp.), 04 September, 2001 (04.09.01), (Family: none)	5-14
Y	JP 2001-321198 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 20 November, 2001 (20.11.01), (Family: none)	14
P,Y	JP 2002-168864 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 14 June, 2002 (14.06.02), (Family: none)	3-14
P,Y	JP 2002-228664 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 14 August, 2002 (14.08.02), (Family: none)	3-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 2000-060554 A (株式会社日立製作所) 200 0.02.29	1, 2
Y	& US 6183970 A	3-14
X	J P 11-512605 A (ナノゲン・インコーポレイテッ ド) 1999.11.02	1, 2
Y	& WO 95/12808 A & US 5605662 A & WO 97/12030 A & EP 764322 A & BR 9506035 A & FI 970957 A & CN 1164894 A & CA 2259406 A	3-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.08.03

国際調査報告の発送日

09.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典



2 J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Masao Washizu, et al., "Electric Manipulation of DNA in Micro fabricated Structures", IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRY APPLICATIONS, Vol. 26, No. 6, p1165-1172, (1990)	3-14
Y	J P 2001-238674 A (株式会社ニコン) 2001. 09. 04 (ファミリーなし)	5-14
Y	J P 2001-321198 A (富士写真フイルム株式会社) 2001. 11. 20 (ファミリーなし)	14
PY	J P 2002-168864 A (日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) 2002. 06. 14 (ファミリーなし)	3-14
PY	J P 2002-228664 A (日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) 2002. 08. 14 (ファミリーなし)	3-14